

三个牦牛群体 DRB3.2 基因 PCR - RFLP 多态性研究

包鹏甲, 阎萍, 梁春年, 郭宪, 丁学智, 裴杰, 褚敏, 朱新书
(中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所甘肃省牦牛繁育工程重点实验室, 兰州 730050)

中图分类号: Q78

文献标识码: A

文章编号: 1004-7034(2012)01-0001-03

关键词: 牦牛; DRB3.2 基因; PCR - RFLP

摘要: 为了研究牦牛 DRB3.2 基因 exon 2 遗传多样性, 试验采用 PCR - RFLP 对天祝白牦牛、甘南牦牛、大通牦牛 3 个类群 757 头个体的 MHC - DRB3.2 基因进行 PCR - RFLP 分析。结果表明: 共检测出 8 个 Hae III 酶切位点、11 种基因型; 在 3 个牦牛类群中, Hae III C 基因型(225 bp/175 bp/85 bp/35 bp) 在大通牦牛、天祝白牦牛中是优势基因型, 基因型频率分别为 0.387 和 0.366; 而在甘南牦牛中, Hae III A 基因型(175 bp/85 bp/35 bp) 为优势基因型, 基因型频率为 0.306。3 个群体的多态信息含量分别为 0.739、0.754、0.743, 均达到了高度多态(PIC > 0.50)。说明牦牛 DRB3.2 基因具有高度多态性, 在研究牦牛抗病育种和提高牦牛生产性能方面具有独特的效力和广泛的应用前景。

The polymorphism study of DRB3.2 gene by PCR - RFLP in three yak populations

BAO Peng - jia, YAN Ping, LIANG Chun - nian, GUO Xian, DING Xue - zhi,
PEI Jie, CHU Min, ZHU Xin - shu

(Lanzhou Institute of Husbandry and Pharmaceutical Sciences of CAAS, Key Laboratory of Yak Breeding Engineering of Gansu Province, Lanzhou 730050, China)

Key words: yak; DRB3.2 gene; PCR - RFLP

Abstract: To study the genetic diversity of DRB3.2 gene, PCR - RFLP was used to analyze the MHC - DRB3.2 genes from 757 yak individuals belonged to three different groups (Tianzhu white yak, Gannan yak and Datong yak). The results showed that 8 Hae III restriction site and 11 genotype were detected. Hae III C (225 bp/175 bp/85 bp/35 bp) was the dominant genotype in Datong yak and Tianzhu white yak, its frequencies were 0.387 and 0.366 respectively. Hae III A (175 bp/85 bp/35 bp) was the dominant genotype in Gannan Yak, its frequency was 0.306. The Polymorphic information contents of three different groups were 0.739, 0.754 and 0.743, respectively. All of them reached high polymorphism (PIC > 0.50). The results indicates that DRB3.2 gene is highly polymorphic, it has a unique effect and wide application prospects of breeding for disease resistance and raising the performance of yak.

1936年, Gorer 首次在小鼠体内发现了主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC)。MHC 基因是基因组中多态性最丰富的基因之一, 编码细胞表面糖蛋白, 主要参与机体的免疫应答调控、抗原识别及诱导免疫反应, 在脊椎动物的免疫系统中起着十分关键的作用。BoLA - DRB 是牛

MHC 基因家族中的 II 类基因, 是该基因家族中最主要的功能基因^[1], 所编码的 MHC 抗原与免疫应答和抗病性密切相关^[2-3]。国外对 BoLA - DRB3.2 基因的诸多研究证实该基因具有高度多态性^[2,4-6]。牦牛 (*Bos grunniens*) 是生活在青藏高原的特有牛种, 终年放牧, 极少有补饲, 但能很好地适应当地高寒、高海拔的恶劣环境, 提供肉、乳、皮、毛等畜产品, 是当地牧民不可或缺的重要生产资料和生活资料。国内相关研究已证实, 牦牛对疾病有较高的抗性, 但对其基因研究的相关报道较少。本研究运用 PCR - RFLP 技术对大通牦牛、天祝白牦牛和甘南牦牛 3 个类群的 DRB3.2 基因进行多态性研究, 旨在为我国牦牛的抗病育种提供基础资料。

1 材料

试验共采集牦牛血样 757 份, 其中大通牦牛血样

收稿日期: 2011-04-11; 修回日期: 2011-11-25

基金项目: 中央公益性科研院所基本科研业务费 (1610322009002); 国家肉牛牦牛产业技术体系 (CARS - 38); 公益行业农业科技专项 (201003061)

作者简介: 包鹏甲 (1980 -), 男, 助理研究员, 硕士, bpjivy8092@126.com.

通信作者: 阎萍 (1963 -), 女, 研究员, 博士, 博士生导师, pi ngyan@sohu.com.

287 份(采自青海大通种牛场)、天祝白牦牛血样 336 份(采自天祝县西大滩、松山、抓西秀龙等乡的牦牛场)、甘南牦牛血样 134 份(采自甘南藏族自治州李恰如种畜场) 5 mL/头, 均为颈静脉血, 用枸橼酸葡萄糖(ACD, acid citrate dextrose) 抗凝 4 °C 条件下运输, 带回实验室后 -20 °C 冻存, 备用。

基因组 DNA 提取试剂盒(Relaxgene Blood DNA system, DP319)、2 × Taq PCR Master Mix(KT201 - 12)、pUC18 DNA/Msp I, 购自天根生化科技(北京) 有限公司; 限制性内切酶 Hae III, 购自纽英伦生物技术(北京) 有限公司。

引物, 参照参考文献 [7] 设计, 委托宝生物工程(大连) 有限公司合成。序列为上游引物 5' - GATG - GATCCTCTCTG CAGCACATTTTCCT - 3'; 下游引物 5' - CTTGAATTCCGCGCTCACCTCGCCGCTG - 3'。

2 方法

2.1 基因组 DNA 的提取

按照基因组 DNA 提取试剂盒操作步骤从冻存血样中提取牦牛基因组 DNA。用紫外分光光度法和 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 的纯度和浓度, 稀释基因组 DNA 样品浓度至 50 ng/μL。

2.2 PCR 扩增

PCR 反应体系: 2 × Taq PCR Master Mix 12.5 μL, 上、下游引物各 1 μL, 模板 DNA 1 μL, 用超纯水补足至 25 μL。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 65 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 40 s, 共 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2.3 酶切

取 PCR 产物 5 μL, 加入 10 U/μL Hae III 内切酶 0.5 μL, 10 × NEB Buffer 1 μL, 用超纯水补至 10 μL, 37 °C 消化过夜, 3% 琼脂糖凝胶电泳检测酶切结果。

2.4 统计分析

基因型频率是一个群体中某一性状的各种基因型之间的比率。由于 PCR - RFLP 检测结果为共显性等位基因, 因此表型频率即为基因型频率。

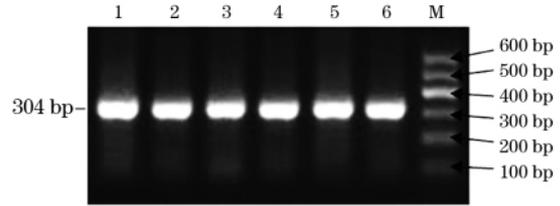
基因型频率 = 基因型个体数 / 测定群体总数。

多态信息含量(polymorphism information content, PIC): 用于对标记基因多态性的估计, PIC > 0.50 为高度多态, 0.25 < PIC < 0.50 为中度多态, PIC < 0.25 为低度多态。计算公式为 $PIC = 1 - \sum_{i=1}^m P_i^2 - \sum_{i=1}^{m-1} \sum_{j=i+1}^m 2P_i^2 P_j^2$, 式中 P_i 和 P_j 分别表示第 i 和第 j 个等位基因在群体中的频率, m 为等位基因数。

3 结果和分析

3.1 牦牛 DRB3.2 基因 PCR 扩增

以牦牛基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 得到 1 条大小约为 304 bp 的特异性条带(见图 1)。



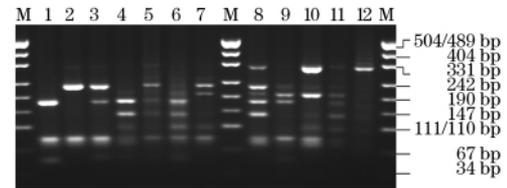
1 ~ 6. 扩增的 DRB3.2 基因 DNA; 7. Marker I。

图 1 PCR 扩增结果

Fig 1 The result of PCR amplification

3.2 牦牛 DRB3.2 基因 RFLP - Hae III 酶切

对大通牦牛、天祝白牦牛、甘南牦牛 3 个牦牛群体的 DRB3.2 基因进行 Hae III 酶切, 通过琼脂糖凝胶电泳发现牦牛 DRB3.2 基因存在较丰富的多态性, 共发现 11 种基因型, 在不同牦牛类群中基因型分布存在一定差异, 其中大通牦牛和甘南牦牛出现 10 种, 天祝白牦牛出现 9 种。图 2 是牦牛 DRB3.2 基因 Hae III 酶切电泳图谱。



M. pUC18 DNA/Msp I; 1 ~ 11. 基因型为 A, B, C, D, E, F, G, H, J, K; 12. 空白对照组。

图 2 牦牛 DRB3.2 基因 Hae III 酶切电泳图谱

Fig 2 Enzyme electrophoresis of Hae III of DRB3.2 gene in yak

由图 2 可见, 共发现 8 个酶切位点, 产生的 8 条带分别约为 225 bp、195 bp、175 bp、140 bp、110 bp、85 bp、60 bp 和 35 bp。

3.3 牦牛 DRB3.2 基因型及基因频率统计(见表 1 2)

表 1 不同基因型在牦牛类群中的基因型频率

Table 1 The gene frequencies of different genotypes in yak populations

基因型	大通牦牛	甘南牦牛	天祝牦牛	基因型	大通牦牛	甘南牦牛	天祝牦牛
A	0.230	0.306	0.202	G	0.017	0.007	0.006
B	0.164	0.119	0.080	H	0.111	0.134	0.235
C	0.387	0.284	0.366	I	0.003	0.007	0.012
D	0.052	0.104	0.051	J	0.003	0.007	0
E	0.010	0	0.006	K	0	0.007	0
F	0.021	0.022	0.042				

在 3 个牦牛类群中, 基因型 Hae III C

表2 不同酶切片段的分布频率

Table 2 The frequency distributions of different restriction fragments

品种	35 bp	60 bp	85 bp	110 bp	140 bp	175 bp	195 bp	225 bp
大通牦牛	0.223 2	0.003 0	0.284 7	0.006 0	0.052 6	0.229 2	0.006 9	0.194 4
甘南牦牛	0.233 8	0	0.279 7	0.006 3	0.075 2	0.242 2	0.008 4	0.154 5
天祝牦牛	0.224 0	0.001 5	0.258 7	0.010 8	0.084 7	0.234 8	0.004 6	0.180 9

(225 bp/175 bp/85 bp/35 bp) 在大通牦牛、天祝白牦牛中是优势基因型,基因型频率分别为 0.387 和 0.366;而在甘南牦牛中,基因型 Hae III A (175 bp/85 bp/35 bp) 为优势基因型,基因型频率为 0.306。

经计算,大通牦牛、天祝白牦牛、甘南牦牛多态信息含量(PIC)分别为 0.739、0.754、0.743,都达到高度多态(PIC > 0.50),说明这 3 个群体多态性高,遗传变异大,在 DRB3.2 基因上选择的潜力比较大。

4 讨论

4.1 关于牦牛 MHC - DRB3.2 基因多态性的探讨

MHC 是广泛存在于哺乳动物中的基因复合体,其在家畜机体免疫系统中具有重要作用,已成为家畜抗病育种的研究热点。具有高度多态性是 MHC 最显著的特点,其中 DRB 位点的多态性最高。本研究通过对牦牛 DRB3.2 基因进行 PCR - RFLP 研究,发现 8 个 Hae III 酶切位点、11 种基因型,多态信息含量在 3 个牦牛类群中均达到了高度多态(PIC > 0.50),证明在牦牛类群中,DRB3.2 基因也具有高度的多态性。

4.2 MHC - DRB3.2 基因与疾病抗性和生产性能的相关性

BoLA 编码抗原参与抗原递呈,特别是 BoLA - DRB3.2 基因,是牛 MHC 基因家族最活跃的功能区域,在牛免疫系统中起着重要的作用^[8]。B. E. Gilliespie 等^[9]、S. Sharif 等^[10]和高树新等^[11]报道,BoLA - DRB3.2 基因与牛奶中的体细胞数(SSC)和奶牛乳房炎的高发病率显著相关,还与胎盘滞留率的低风险性显著相关。A. B. Dietz 等^[12]对 1 100 头美国荷斯坦泌乳母牛的 BoLA - DRB3.2 基因座进行基因分析,发现 BoLA - DRB3.2 基因的第 8、16、22、23 号等位基因均与不同时期的高 SCC 相关,并指出 BoLA - DRB3.2 * 16 对高的 SCC 是一个危险因素。S. Sharif 等^[10]通过克隆表达 BoLA - DRB3.2 * 22、* 23 和 * 24 的多肽,揭示了这些等位基因与金黄色葡萄球菌引起临床型乳房炎的相关性。杨东英等^[13]利用 PCR - RFLP 技术对易感染和不易感染乳房炎的 90 个奶牛个体 DRB3.2 基因进行分析发现,BoLA 等位基因 A 作为母牛乳房炎易感性的候选标记具有潜在的有效性。M. N. Ruzina 等^[14]运用 PCR - RFLP 技术对 Kalmyk、Yakut 和 Mongolian 牛 DRB3 基因进行研

究,发现 Mongolian 和 Kalmyk 牛具有高度多态性,而 Yakut 牛多态性比较低,分析原因可能是近亲交配和长时间的小群体隔离造成的。

由于青藏高原特殊的地理环境和气候条件及长期的自然选择和人为干预,形成了现在广泛分布于这一区域、具有较好适应性和抗逆性的牦牛类群,MHC 基因的高度多态性及其在动物机体免疫系统中的重要功能,使其在研究牦牛抗病育种和提高牦牛生产性能方面表现出独特的效力和广泛的应用前景。

参考文献:

- [1] TAKESHIMA S, AIDA Y. Structure, function and disease susceptibility of the bovine major histocompatibility complex[J]. Anim Sci J 2006, 77(2): 138 - 150.
- [2] TAKESHIMA S, NAKAI Y, OHTA M, et al. Short communication: characterization of DRB3 alleles in the MHC of Japanese shorthorn cattle by polymerase chain reaction - sequence - based typing[J]. J Dairy Sci 2002, 85(6): 1630 - 1632.
- [3] 杨清芳, 李祥龙, 周荣艳, 等. 不同物种 MHC - DRB1 基因外显子 2 生物信息学分析[J]. 黑龙江畜牧兽医 2010(7): 11 - 13.
- [4] GELHAUS A, SCHNITTGER L, MEHLITZ D, et al. Sequence and PCR - RFLP analysis of 14 novel BoLA - DRB3 alleles[J]. Anim Genet, 1995, 26(3): 147 - 153.
- [5] LEDWIDGE S A, MALLARD B A, GIBSON J P, et al. Multi - primer target PCR for rapid identification of bovine DRB3 alleles[J]. Anim Genet 2001, 32(4): 219 - 221.
- [6] SENA L, SCHNEIDER M P, BREINIG B, et al. Related articles, links polymorphisms in MHC - DRA and - DRB alleles of water buffalo (*Bubalus bubalis*) reveal different features from cattle DR alleles[J]. Anim Genet 2003, 34(1): 1 - 10.
- [7] SIGURDARDOTTIR S, BORSCH C, GUSTAFSSON K, et al. Cloning and sequence analysis of 14 DRB alleles of the bovine major histocompatibility complex by using the polymerase chain reaction[J]. Anim Genet, 1991, 22(3): 199 - 209.
- [8] 王兴平, 徐尚忠, 詹林森, 等. 牛抗病基因 BoLA - DRB3 的新等位基因的发现[J]. 畜牧兽医学报 2006, 37(7): 722 - 726.
- [9] GILLIESPIE B E, JAYARAO B M, DOWLEN H H, et al. Analysis and frequency of bovine lymphocyte antigen DRB3.2 alleles in Jersey cows[J]. J Dairy Sci, 1999, 82(9): 2049 - 2053.
- [10] SHARIF S, MALLARD B A, WILKIE B N, et al. Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLA - DRB3) with production traits in Canadian dairy cattle[J]. Anim Genet, 1999, 30(2): 157 - 160.
- [11] 高树新, 许尚忠, 李金泉, 等. BoLA - DQA、DRB3 exon2 多态性及其与奶牛乳房炎的关联分析[J]. 畜牧兽医学报, 2006, 37(4): 317 - 320.
- [12] DIETZ A B, DCTILLEUX J C, FREEMAN A E, et al. Genetic association of bovine lymphocyte antigen DRB3 alleles with immunological traits of Holstein cattle[J]. J Dairy Sci, 1997, 80(2): 400 - 405.
- [13] 杨东英, 陈宏, 张良志, 等. 牛 BoLA - DRB3 基因的多态性与乳房炎相关性初探[J]. 中国兽医杂志 2006, 42(7): 42 - 44.
- [14] RUZINA M N, SHTYFURKO T A, MOHAMMADABADI M R, et al. Polymorphism of the BoLA - DRB3 gene in the Mongolian, Kalmyk, and Yakut cattle breeds[J]. Genetika 2010, 46(4): 517 - 525.

(009)